

江苏省地方标准

DB32/T 3686—2019

山羊副流感病毒 3 型检测技术规程

Technical regulations for detection of *Caprine parainfluenza virus 3*

2019-12-03 发布

2019-12-25 实施

江苏省市场监督管理局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由江苏省农业科学院提出并归口。

本标准起草单位：江苏省农业科学院。

本标准主要起草人：李文良、毛立、李基棕、郝飞、刘茂军、杨蕾蕾、孙敏。

山羊副流感病毒 3 型检测技术规程

1 范围

本标准规定了山羊副流感病毒 3 型(Caprine parainfluenza virus 3, CPIV3)的病原学检测(病毒核酸的 RT-PCR 和荧光定量 RT-PCR 检测)、血清学检测[血凝抑制(HI)试验]的技术要求。

本标准适用于山羊副流感病毒 3 型及其感染情况的实验室检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 病原学检测

3.1 材料

材料包括:微量移液器、DEPC 水处理的 EP 管、DEPC 水处理的吸头、PCR 扩增管、TRIzol 试剂、三氯甲烷、异丙醇、DEPC 处理水(用水符合 GB/T 6682 的规定)、反转录酶/Taq DNA 聚合酶混合液、2×一步法 RT-PCR 反应缓冲液、一步法荧光定量 RT-PCR 试剂盒、TAE 缓冲液、琼脂糖、核酸染料、引物 MF/MR、引物 qMF/qMR 与探针(参见附录 A)。

3.2 仪器设备

仪器设备包括:PCR 仪、荧光定量 PCR 仪、台式冷冻离心机、电泳仪和水平电泳槽、凝胶成像仪(或紫外透射仪)。

3.3 反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)

3.3.1 样品处理与 RNA 的提取

采集羊的鼻拭子、气管拭子或肺脏(样品的采集、保存和运输应符合 NY/T 541 的相关规定)。取 200 μ L 待检样品液至无菌、无 RNA 酶的 EP 管中,使用 TRIzol 试剂、RNA 提取试剂盒或自动化核酸提取仪等方法提取 RNA。

3.3.2 RT-PCR 反应

RT-PCR 反应使用 20 μ L 体系:10 μ L 2×一步法 RT-PCR 反应缓冲液、引物 MF/MR 各 0.5 μ L (10 μ mol/L)、0.4 μ L 反转录酶/Taq DNA 聚合酶混合液、4 μ L RNA 模板,4.6 μ L DEPC 处理水。

反应条件为:45 $^{\circ}$ C 反转录 30 min;94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,54 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,进行 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。